

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 47440	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/FI 99/00347	International filing date (<i>day/month/year</i>) 28 April 1999	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 29 April 1998
Applicant Savolainen, Jouko		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).
2. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).
3. ☐ The international application contains disclosure of a nucleotide and/or amino acid sequence listing and the international search was carried out on the basis of the sequence listing
 - ☐ filed with the international application.
 - ☐ furnished by the applicant separately from the international application,
 - ☐ but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed.
 - ☐ transcribed by this Authority.
4. With regard to the title, ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
 - ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the abstract,
 - ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
 - ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. The figure of the drawings to be published with the abstract is:
 - Figure No. --- ☐ as suggested by the applicant. ☐ None of the figures.
 - ☐ because the applicant failed to suggest a figure.
 - ☐ because this figure better characterizes the invention.

1
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 99/00347

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: A23J 1/20, A23J 3/08, A23J 3/16,, A23C 9/00, A23C 21/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: A23J, A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9522907 A1 (SAVOLAINEN, JOUKO), 31 August 1995 (31.08.95) --	1-12
X	J. AGRIC. FOOD CHEM., Volume 43, 1995, Silvana Petruccelli et al, "Partial Reduction of Soy Protein Isolate Disulfide Bonds" page 2001 - page 2006 --	1-12
A	JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, Volume 37, No 5, 1989, Navin K.D. Kella et al, "Effect of Disulfide Bond Cleavage on Structural and Interfacial Properties of Whey Proteins" page 1203 - page 1210 --	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 1999

Date of mailing of the international search report

10 -08- 1999

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Eva Johansson/ELY
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 99/00347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOUNRLA OF FOOD SCIENCE, Volume 55, No 6, 1990, Juan M. Gonzalez et al, "Recovery of Protein from Raw Sweet Whey Using a Solid State Sulfitolysis" page 2 - page 6 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/07/99

International application No.

PCT/FI 99/00347

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9522907 A1	31/08/95	AU 681250 B	21/08/97
		AU 1710095 A	11/09/95
		EP 0796047 A	24/09/97
		FI 96266 B,C	29/02/96
		FI 101514 B	00/00/00
		FI 940846 A	24/08/95
		FI 944110 A	24/08/95
		JP 9509320 T	22/09/97
		NZ 279847 A	19/12/97
		US 5834042 A	10/11/98

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

RECORD COPY

1/3

PCT REQUEST

47440

Original (for SUBMISSION) - printed on 28.04.1999 12:00:30 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	PCT/FI 99 / 0 0 3 4 7
0-2	International Filing Date	28 APR 1999 (28.04.99)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	The Finnish Patent Office PCT International Application
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request Prepared using	PCT-EASY Version 2.83 (updated 01.03.1999)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	National Board of Patents and Registration (Finland) (RO/FI)
0-7	Applicant's or agent's file reference	47440
I	Title of Invention	METHOD FOR ISOLATION AND MODIFICATION OF PROTEINS
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant and inventor
II-2	Applicant for	all designated States
II-4	Name (LAST, First)	SAVOLAINEN, Jouko
II-5	Address:	Kuurinniityntie 26 FIN-02750 Kauniainen Finland
II-6	State of nationality	FI
II-7	State of residence	FI
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name	BERGGREN OY AB
IV-1-2	Address:	P.O. Box 16 FIN-00101 Helsinki Finland
IV-1-3	Telephone No.	+358-9-693701
IV-1-4	Facsimile No.	+358-9-6933944
IV-1-5	e-mail	email.box@berggren.elisa.fi

PCT REQUEST

47440


Original (for SUBMISSION) - printed on 28.04.1999 12:00:30 PM

V	Designation of States		
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT	
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AU NZ US	
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	29 April 1998 (29.04.1998)	
VI-1-2	Number	980945	
VI-1-3	Country	FI	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Swedish Patent Office (ISA/SE)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	3	-
VIII-2	Description	17	-
VIII-3	Claims	2	-
VIII-4	Abstract	1	47440.txt
VIII-5	Drawings	0	-
VIII-7	TOTAL	23	

PCT REQUEST

47440

Original (for SUBMISSION) - printed on 28.04.1999 12:00:30 PM

	Acc mpanying It ms	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-9	Separate signed power of attorney	✓	-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-17	Other (specified):	Copy of official action in FI 980945.	-
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the international application	Finnish	
IX-1	Signature of applicant or agent		
IX-1-1	Name	BERGGREN OY AB	
IX-1-2	Name of signatory	Ira Risku	
IX-1-3	Capacity	Patent Agent	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	28 APR 1999	(28 -04- 1999)
10-2	Drawings:		
10-2-1	Received		
10-2-2	Not received		
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application		
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)		
10-5	International Searching Authority	ISA/ SE	
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid		

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	(26.05.99)	26 MAY 1999
------	---	--------------	-------------

Menetelmä proteiinien eristämiseksi ja muuntelemiseksi

5 Keksintö koskee menetelmää proteiinien eristämiseksi, erityisesti herasta tai soijasta ja eristettyjen proteiinien muuntelemiseksi, saattamalla proteiinit, erityisesti hera tai soija tai sen konsentraatti, kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi.

10 Heraproteiinit ovat muihin proteiineihin nähden ravintoarvoltaan ylivoimaisia erityisesti lyysiini- ja metioniinipitoisuutensa vuoksi. Heraproteiinien jalostus ihmisravinnoksi ja terveysvaikutteisiksi ravintotuotteiksi nostaisi heran jalostusarvoa ja lisäisi näin juustontuotannon kannattavuutta. Vaikka heraproteiinilla on hyvät käyttöedellytykset elintarvikeraaka-aineena, suurimpina esteinä sen käytölle ovat talteenotto-

15 prosessien ja fraktioiden eristysprosessien kalleus sekä proteiinikonsentraattien ja isolaattien vaihtelevat ja heikot toiminnalliset ominaisuudet, kuten huono liukoisuus, emulgoituvuus, geelilytyvyys ja vaahtoutuvuus.

Heran proteiinien eristämistä vaikeuttaa niiden hyvä liukoisuus, eikä siihen voida vaikuttaa pH:n muutoksella välillä pH 2-9 proteiinien ollessa natiivissa muodossa.

20 Proteiineja voidaan eristää neljän päämenetelmän mukaisesti: 1. denaturointi kuumentamalla ja saostus, 2. ultrasuodatus, 3. ioninvaihto ja 4. kemiallinen muuntelu ja saostus.

Yleisimmin tunnettu menetelmä heraproteiinien eristämiseksi on kuumennusdenaturointi ja pH:n laskeminen happamalle puolelle. Tällä menetelmällä saadaan proteiini, joka on menettänyt lähes kaikki tärkeimmistä toiminnallisista ominaisuuksistaan. Sitä käytetään pääasiassa erilaisissa levitteissä, esimerkiksi sulatejuustoissa, osittain tai kokonaan korvaamaan juusto (Hill et al., Can. Int. Food Sci. Technol. J. 15 (1982), 155-160).

30 Nykyään heran proteiinit eristetään pääasiassa proteiinikonsentraattina käyttämällä ultrasuodatusta ja kuivausta tai proteiini-isolaattina käyttämällä ioninvaihtoadsorptiotekniikkaa ja kuivausta. Molemmilla menetelmillä on mahdollista saada eristetyt proteiinit toiminnallisina. Määräävänä tekijänä näiden tuotantomenetelmien valinnassa on saavutettava tuotteen toiminnallisuus ja tuotantokustannukset.

35

Edellä mainituilla menetelmillä aikaansaatuja proteiinikonsentraattien koostumuksessa, toiminnallisuudessa sekä aistittavissa ominaisuuksissa esiintyy kuitenkin

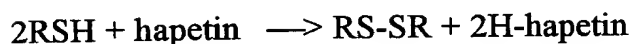
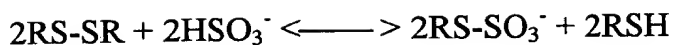
suurta vaihtelua ja sen vuoksi teollisuus vieroksuu niiden käyttöä. Vaihtelu johtuu käytettävän heran erilaisesta koostumuksesta ja esikäsittelyn sekä valmistus- ja käsittelyolosuhteiden erilaisuudesta.

- 5 Proteiini-isolaateissakin esiintyy edellä mainituista syistä eri ominaisuuksien vaihtelua. Niiden valmistuksessa käytetty ioninvaihtoadsorptiomenetelmä tasaa vaihtelua jonkin verran ja antaa koostumukseltaan erilaisen lopputuotteen kuin ultrasuodatuksella tuotettu proteiinikonsentraatti on. On havaittu, että isolaatit ovat selvästi laadukkaampia ja toiminnallisempia kuin konsentraatit proteiinin ja rasvan määrän suhteen sekä proteiinin liukoisuuden, vaahtoavuuden ja vaahton pysyvyyden, proteiinin denaturoimattomuuden ja kokkareisuuden sekä maun ja hajun suhteen. Konsentraattien suhteellisen korkea laktoosi- ja mineraalipitoisuus sekä heikko maku ja haju ovat tekijöitä, jotka rajoittavat konsentraattien käyttöä elintarviketeollisuudessa. Heraproteiini-isolaattien käyttökelpoisuutta rajoittaa hyvistä ominaisuuksista huolimatta valmistusmenetelmästä johtuva tuotteen korkea hinta.

- 20 Tunnettua on myös, että muuttamalla proteiinien rakennetta kemiallisella reaktiolla voidaan vaikuttaa molekyylin avaruusrakenteeseen/konformaatioon, varaukseen ja hydrofobisuuteen sekä siten proteiinin eräisiin muihinkin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja emulgoituvuuteen.

- 25 Käytännöllisin ja yksinkertaisin kemiallinen menetelmä proteiinin molekyylin rakenteen muuntelussa on sulfonointi, tarkemmin tiolisulfonointi eli S-sulfonointi, joka saadaan aikaan oksidatiivisella sulfitolyysillä. Siinä proteiinien aminohappoketjujen väliset rikkisillat eli disulfidisidokset aukaistaan, mikä saadaan aikaan lisäämällä sulfiitti-ioneja, jolloin käynnistyy hapetuspelkistysreaktio, jossa toinen rikki hapetuu sulfonaatiksi ja toinen pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi.

- 30 Lisäämällä mukaan vielä hapettava tekijä hapettuvat vapaat sulfhydryyliryhmät jälleen disulfidisidoksiksi, jotka puolestaan jatkavat reaktiossa niin kauan, kunnes kaikki sulfhydryyliryhmät ovat sulfonoituneet tai reaktion jokin muu tekijä on muodostunut rajoittavaksi. Oksidatiivisen sulfitolyysin periaate on kuvattu seuraavilla yhtälöillä:



Siinä RS-SR kuvaa proteiinimolekyyliä, joka koostuu kahdesta aminohappoketjusta R, jolloin S-S on kahden aminohappoketjun välissä oleva disulfidisidos. Se yhdistää aminohappoketjut ja pitää niitä osaltaan lukittuna tiettyyn asentoon. Muunnellut
10 proteiinimolekyylit ovat saostettavissa liuoksesta laskemalla pH:ta sulfitolyysireaktion pH:sta pH 3-5:een.

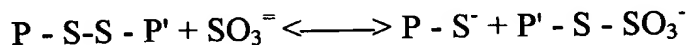
Oksidatiivista sulfitolyysiä on julkaisussa Kella, N. K. D. et al., J. Agr. Food Chem. 37, (1989), 1203-1210, käytetty heran proteiini-isolaattien molekyyliden muunteluun
15 tarkoituksena vaikuttaa proteiinien toiminnallisiin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja vaahtodon pysyvyyteen. Ominaisuuksiin vaikuttavana tekijänä oli disulfidisidosten vähentäminen suhteessa alkuperäisten disulfidisidosten määrään. Tiedetyt ominaisuudet paranivat tai huononivat disulfidisidosten määrän vähetessä. Mm. liukoisuus huononi alle 5 %:n jo 25 %:n disulfidisidoksista
20 avauduttua ja samalla liukoisuus-pH-käyrän liukoisuusminimi muuttui.

Muuntelureaktiossa proteiini-isolaattien konsentraatio oli 1,0 % ja sulfiitin 0,1 M, urean 4 M sekä pH 7,0 ja lämpötila 25 °C. Hapettimena käytettiin liuoksen läpi puhallettua happea ja katalysaattorina CuSO₄:a liuotettuna 800 mM konsentraatioon.
25 Eriasteisesti muunnellut proteiini-isolaatit eristettiin saostamalla ammoniumsulfatilla, jota lisättiin liuokseen niin paljon, että siitä muodostui 50-prosenttisesti kyllästetty. Muuttuneita liukoisuusominaisuuksia ei käytetty hyväksi proteiinien eristämässä.

30 Julkaisussa Gonzalez, J. M., Damodaran, S., J. Food Sci., 55 (1990), no 6, 1559-1563, käytettiin oksidatiivista sulfitolyysiä tarkoituksena eristää sellaisen makean raaka-heran proteiineja, jonka proteiinipitoisuus oli noin 0,6 %, lähes samoissa koeolosuhteissa kuin edellä; pH 7,0, sulfiittikonsentraatio 0,1 M, lämpötila 25 °C sekä hapettimena happi ja katalysaattorina Cu²⁺-ioni CuCO₃:na, mutta tässä tapauksessa
35 kiinteinä helminä ja pakattuna lasikolonnin. Sulfitolyysin tuote hapetettiin sulfo-naattijohdannaiseksi kierrättämällä sitä mainituilla helmillä täytetyssä kolonnissa. Sen jälkeen helmien jäännökset poistettiin nestemäisestä reaktioseoksesta sentrifugoimalla. Tekijät osoittivat, että pelkällä sulfitolyysillä eli 0,1 M:n sulfiittilisäyksen

- jälkeen edellä kuvatuissa olosuhteissa vain noin 0,4 moolia disulfidi- ja sulphydryyliryhmistä 43000 grammamoolia proteiinia kohti sulfonoitui 30 minuutissa, ja senkin oletettiin johtuneen heran luontaisesta hapetuskyvystä. Vastaavissa olosuhteissa hapetettaessa hapella katalysaattorin avulla noin 1,5 moolia disulfidi- ja sulphydryyliryhmistä sulfonoitui 3 minuutissa ja noin 2,3 moolia 30 minuutissa. Sulfonoidut ja kuparin kanssa kelatoituneet proteiinit eristettiin toiminnallisina saostamalla pH:ssa 4,5. Ennen saostamista liuksesta jouduttiin kuitenkin poistamaan sulfonoituun heran proteiiniin kelatoitunut kupari EDTA-käsittelyllä.
- 10 Tässä oli kysymyksessä monimutkainen laboratoriomittakaavan toteutus konsentroimattomalla heraproteiinilla. Siinä ei voitu hyödyntää korotetun lämpötilan reaktiota nopeuttavaa vaikutusta, koska hapen liukoisuus ja siten sen pitoisuus liuoksessa pienenee niin, että se on reaktiota rajoittava tekijä. Lisäksi elektrolyyttien runsas mukanaolo vielä rajoittaa hapen liukoisuutta ja siten myös happipitoisuutta.
- 15 Oksidatiivista sulfitolyysiä (Kella, N. K. D., et al., J. Agr. Food Chem., 37 (1989), 1203-1210) on käytetty soijaproteiinien, esimerkiksi glysiinin, jaotteluun/fraktiointiin pienemmiksi alayksiköiksi. Glysiini koostuu useasta alayksiköstä, jotka ovat puolestaan muodostuneet kahdesta polypeptidistä. Polypeptidit ovat kiinnittyneet toisiinsa yhdellä disulfidisidoksella, joten aukaisemalla disulfidisidoksia oksidatiivisella sulfitolyysillä proteiini on jaoteltavissa pienempiin osiin, mikä vaikuttaa puolestaan toiminnallisiin ominaisuuksiin mm. emulgoituvuuteen, geelilytyvyyteen ja vaahtoutuvuuteen kuten Petracelli, S. ja Anón, M. C., J. Agric. Food Chem., 43 (1995), 2001-2006, ovat osoittaneet.
- 25 Sulfitolyysiä on myös käytetty soijan biologisesti aktiivisen proteiinin, trypsiini-inhibiittorin rakenteen/konformaation muunteluun siten, että ihmisen ruoansulatukselle haitallisen proteiinin aktiivisuus katoaa. Trypsiini-inhibiittori on inaktivoitavissa kuumentamalla, mutta 1 tunnin kuumennus 75 °C:ssa tai 10 min kuumennus 100 °C:ssa inaktivoi inhibiittorista vain noin 80 %. Kuumennuksen jatkaminen aiheuttaa proteiinin ravintoarvon alentumista. Kuumentamalla yhden tunnin ajan soijajauhoa 700 g 2,1 litrassa 0,5 M Tris-puskuria pH 8,5, jossa on Na₂SO₃:a 4,78 g (0,03 moolia), trypsiini-inhibiittorin aktiivisuus hävisi kokonaan. Jäännössulfiitin poistamiseen käytettiin dialysointia, joka kesti 3 päivää. Vaihtoehdoksi sulfiitin poistoon suositeltiin proteiinien saostamista isoelektrisessä pisteessä, pH 4,5:ssä, jota käytetään saostukseen soijaisolaatin teollisessa valmistuksessa. Toimenpiteessä hyödynnetään jäljempänä esitetyssä reaktiossa vapautuneen sulfiitin pesemistä pois proteiinin eristyksen yhteydessä.

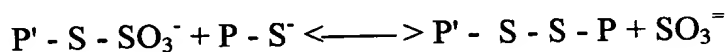
Trypsiini-inhibiittorin rakenteen/konformaation muuntelun selitettiin perustuvan sulfiitin aiheuttamaan disulfidiryhmän avautumiseen seuraavan kaavan mukaan:



5

Sen jälkeen muodostunut S-sulfonaatti reagoi toisen sulfhydryyliryhmän kanssa, joka on jo ollut olemassa tai muodostunut samassa sulfitolyysissä ja muodostaa sen kanssa uuden disulfidiryhmän eri paikkaan proteiinimolekyylissä. Samalla vapautuu S-sulfonaattiryhmästä sulfiittia seuraavan kaavan mukaan:

10



15

Kokonaisvaikutus on uuden disulfidiryhmän muodostuminen ja lähes kaiken sulfiitin vapautuminen (Friedman, M. ja Gumbmann, M. R., J. Food Sci. 51 (1986), 1239-1241).

20

Edellä esitetyt sovellutukset, jotka perustuvat oksidatiiviselle sulfitolyysille, eivät joko pyrkineet tarjoamaan ratkaisua eristämiseksi, vaan ainoastaan tiettyjen ominaisuuksien muunteluun hera- ja soijaproteiineilla, tai esitetty ratkaisu on niin vaikeasti hyödynnettävissä tuotantomitassa, ettei se ole ollut toteuttamiskelpoinen. Sama koskee sulfitolyysin käyttöä biologisesti aktiivisten proteiinien inaktivointiin ja molekyylirakenteen muunteluun soijalla.

25

FI-patentissa 96266 "Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi" ja FI-patenttihakemuksessa 944110 "Menetelmä ja laite heraproteiinien eristämiseksi" on kehitetty menetelmä ja prosessi, jossa on pyritty mahdollisimman yksinkertaiseen, toimivaan ja taloudelliseen heran proteiinien eristämiseen ja fraktiointiin ja tuottamaan mahdollisimman toiminnallisia proteiineja, joilla on toiminnallisina ominaisuuksina mm. emulgoituvuus, geelilytyvyys ja vaahtoutuvuus. Tuotteet on tarkoitettu tasoltaan ihmisravintona käytettäväksi.

30

Edellä mainitussa suomalaisessa keksinnössä heraproteiinit käytetään 4-16 kertaa konsentroituna, jolloin niiden proteiinipitoisuus on 2-7 paino/tilavuus-%. Oksidatiivinen sulfitolyysi suoritetaan lisäämällä heraproteiinikonsentraattiin sulfiittia sellainen määrä, jolla voidaan säädellä aukaistujen ja sulfonoitujen disulfidisidosten suhdetta disulfidisidosten alkuperäiseen määrään.

35

Hapetus suoritetaan sulfitolyysin jälkeen sopivalla elintarvikekäyttöön kelpaavalla ja hallittavalla kemiallisella yhdisteellä esimerkiksi CaO_2 :lla, jolloin vältetään hankala hapen ja katalysaattorin käyttö ja siihen liittyvät rajoitukset. Reaktiolämpötilana käytetään 30-55 °C ja reaktio-pH:na 5,0-8,5.

5

Sulfonoidut heraproteiinit ovat saostettavissa alentamalla pH:ta 2,5-5,5:een. Alentamalla pH:ta eri pH-tasolle voidaan heraproteiinista saostaa koostumukseltaan erilaisia fraktioita, joissa on heran pääproteiineja α -laktalbumiinia, BSA:ta (naudan seerumialbumiinia) ja β -laktoglobuliinia eri suhteissa.

10

Happamessa, saostuksen yhteydessä vapautuvat oksidatiivisessa sulfitolyysissä muodostuneet S-sulfoniryhmät sekä jäljellä oleva sulfiitti muutetaan rikkidioksidiksi, joka puhalletaan pois sopivalla steriilillä kaasulla ja otetaan neutraloimalla talteen uudelleenkäyttöä varten.

15

Saostettu proteiinifraktio erotetaan mikrosuodattamalla sekä konsentroidaan ja pestään ultrasuodattamalla. Tuloksena on proteiinifraktiokonsentraatti, jossa on tietty proteiini-, laktoosi- ja suolapitoisuus. Liukoisen fraktion proteiinit konsentroidaan ja pestään ultrasuodattamalla, minkä tuloksena saadaan halutunlainen proteiinifraktiokonsentraatti.

20

Vaikka edellä esitetyissä suomalaisissa keksinnöissä heraproteiinien eristys erilaisina fraktioina yksinkertaistui ja eristys ensimmäistä kertaa toteutettiin aiempaa suuremmassa mittakaavassa ja sen taloudellinen toteuttaminen oli mahdollista, koko eristysprosessissa on vielä monta vaihetta, jotka pidentävät prosessiaikaa ja monimutkaistavat käsittelyä aiheuttaen kustannuksia.

25

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on yksinkertaistaa proteiinien, erityisesti hera- ja soijaproteiinien sekä eräiden muiden proteiinien sulfonoimalla tapahtuvaa muuntelua ja nopeuttaa fraktiointitapahtumaa sekä fraktioiden jatkokäsittelyä. Tämä on saatu aikaan siten kuin on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

30

Esillä olevassa keksinnössä on oivallettu, että proteiinien, kuten hera- tai soijaproteiinien, muuntelussa sulfitolyysi yksistään aiheuttaa jo riittävän disulfididisosten aukeamisen eikä hapetus ole välttämätön proteiinimolekyylin konformaation muuttamiseksi ja proteiinien saostamiseksi happamissa olosuhteissa. Hapetuksen poisjääminen yksinkertaistaa ja nopeuttaa prosessia ja parantaa sen kannattavuutta. Käytämällä heraproteiinien sulfitolyysin reaktiolämpötilana noin 40-65 °C reaktio no-

35

peutuu ja reaktiotasapaino siirtyy sulfonoitujen tuotteiden puolelle, jolloin tarvittavan sulfiitin määrä pienenee.

5 Seuraavassa keksintöä kuvataan sovellettuna heraproteiinin muunteluun ja eristämiseen, mutta keksinnön mukainen menetelmä soveltuu käytettäväksi myös muiden proteiinien, kuten soijaproteiinin, käsittelyyn.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään taloudellisista syistä mahdollisimman korkean proteiinipitoisuuden omaavaa heraproteiinikonsentraattia. Edullisimmaksi on osoittautunut noin 16-20-kertaa alkuperäiseen heraan nähden konsentroitua heraproteiini. Sen proteiinipitoisuus on 9-12 paino-%.

15 Keksinnön mukaisesti hera- tai soijaproteiinien muuntelu, disulfididosten avaaminen ja konformaation muuntelu saadaan aikaan sulfitolyysillä, jossa sulfiitti-ioni reagoi spesifisesti disulfididoksen toisen rikin kanssa ja muodostaa S-sulfonaattijohdannaisen. Toinen rikki pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi. Käyttökelpoisimpia sulfiitteja ovat liukoiset ja elintarvikelaatuiset natriumsulfiitti, natriumvetysulfiitti sekä natriummetabisulfiitti, mutta myös muita voidaan käyttää. Kaikista edellä nimeltä mainituista muodostuu reaktio-olosuhteissa valtaosaltaan natrium- ja natriumvety-

20 sulfiittia. Lopputuotteiden toiminnallisiin ja muihin ominaisuuksiin pystytään vaikuttamaan valmistusprosessin sulfitolyysillä määrittelemällä sulfiitin määrän suhde proteiinissa olevien disulfididosten määrään. Heraproteiinien sulfitolyysissä sopiva sulfiitin määrä on välillä 0,02-0,20 M, edullisesti 0,05-0,10 M.

25 pH:hon perustuvan saostuksen kannalta sulfitolyysillä sulfonoidut hera- tai soijaproteiinit eivät tarvitse hapetusta ja siten sulfonoinnin jatkaminen niin, että kaikki sulfitolyysissä vapautuneet sulfhydryyliryhmät sulfonoituisivat, ei ole tarpeen. Oksidatiivinen sulfitolyysi eli sulfitolyysi ja hapetus on käyttökelpoinen menetelmä silloin, kun tilanne ja olosuhteet vaativat aukaistujen disulfididosten molempien rikki-

30 atomien sulfonointia.

Keksinnön mukaisen menetelmän optimoimiseksi on määriteltävä myös sopiva reaktiolämpötila, pH, saostuksissa käytetyt pH:t, pH:n muutoksissa käytetyt hapot ja emäkset, muut reagenssit sekä sopivat toimenpiteet ja menetelmät haluttujen ominaisuuksien saamiseksi tuotteille, jotka voivat olla proteiinikonsentraatteja tai suihkekuivattuja jauheita.

35

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan sulfitolyysin lämpötila on 40-65 °C. Sulfitolyysi tapahtuu pH:ssa 5,5-8,0, edullisesti 6,0-7,0. Reaktioaika on 10-50 min, edullisesti 20-40 min.

- 5 Edellä mainituilla tekijöillä pystytään vaikuttamaan muunneltujen proteiinien ja fraktioiden toiminnallisiin ominaisuuksiin sekä saostus-pH:lla fraktioiden määrään ja koostumukseen α -laktalbumiiniin, BSA:han ja β -laktoglobuliiniin nähden.

- 10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä suoritetaan ensin heraproteiinikonsentraatin proteiinien muuntelu sulfitolyysillä ja sen jälkeen heraproteiinien tietyn osan saostus happamassa pH:ssa. Saostus suoritetaan pH:ssa 1,5-5,5 ja edullisesti pH:ssa 4,0-5,0 ja lämpötilan ollessa tarpeeksi korkea, edullisesti 40-65 °C, edullisimmin välillä 50-60 °C.

- 15 Sulfitolyysillä muunnellut proteiinit voidaan jättää saostamattakin, jolloin saadaan eri asteisesti muunneltuja heran kokonaisproteiineja, joiden proteiini-koostumus on sama kuin herakonsentraatin alkuperäinen koostumus, mutta sen toiminnalliset ominaisuudet ovat muuttuneet muunteluasteesta riippuen.

- 20 Saostuksessa tai erikseen suoritettavassa toimenpiteessä pH:n ollessa selvästi happaman puolella, pH 1,5-4,5, sulfitolyysissä muodostuneet sulfoniryhmät ja sulfitolyysissä jäljelle jäänyt sulfiitti vapautuvat rikkidioksidina ja se johdetaan puhaltamalla steriilillä kaasulla, edullisesti ilmalla tai sen typpiseoksella, vastaanottosäiliöön, jossa se otetaan talteen natrium- ja natriumvetysulfiitin seoksena ja on käytettävissä seuraavassa sulfitolyysissä. Vapautunut rikkidioksidi voidaan siis käyttää uudelleen, mikä säästää kyseistä raaka-ainetta eikä prosessi rasita ympäristöä rikkidioksidipäästöillä.

- 30 Fraktioimattomaksi jätettävän heraproteiinin pH lasketaan happamen puolelle arvoihin, jossa saadaan vapautetuksi sulfoniryhmät ja jäljelle jäänyt sulfiitti rikkidioksidina, joka puhalletaan edellä kuvatulla tavalla.

- 35 Haluttaessa saostuksen jälkeen voidaan toteuttaa fraktiointi, jossa saostuma eli saostettu proteiini erotetaan sopivalla menetelmällä, edullisesti mikrosuodattamalla tai sentrifugoimalla, liukoisesta proteiinista. Haluttaessa muunneltuja kokonaisproteiineja erotus jätetään suorittamatta.

Fraktiot pestään haluttaessa ja konsentroidaan ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai lähellä sitä. Pesulla tarkoitetaan edullisesti diasuodatusta, jossa pestävään liuokseen tai suspensioon lisätään puhdasta vettä ja sekoituksen jälkeen suodatetaan se pois, jolloin pienimolekyyllisiä yhdisteitä, kuten suoloja ja laktoosia, poistuu suodoksen mukana. Toimenpidettä voidaan jatkaa niin kauan, kunnes saavutetaan haluttu koostumus, proteiini-, laktoosi- ja suolapitoisuus, käsiteltävälle fraktiolle.

Muunteluaste osoittaa avautuneiden disulfididisidosten määrän. Happamissa olosuhteissa pH 1,5-4,5 vapautuvat sulfitolyysissä muodostuneet sulfoniryhmät, jolloin avautuneesta disulfidiryhmästä jää jäljelle kaksi sulfhydryyliryhmää. Lopputuotteena käytettävä muunneltu kokonaisproteiinikonsentraatti ja proteiinifraktiokonsentraatit tai niistä kuivatut jauheet voivat olla tätä tyyppiä, jolloin vapaita sulfhydryyliryhmiä voidaan hyödyntää monella tavalla parantuneina toiminnallisina ominaisuuksina, kuten emulgoituvuutena, geelityvyytinä, vaahtoutuvuutena ja hydrolysoituvuutena/sulavuutena.

Vapaat sulfhydryyliryhmät aiheuttavat helposti sopivissa olosuhteissa disulfidiryhmien avautumista ja syntyneet sulfhydryyliryhmät muodostavat toisten sulfhydryyliryhmien kanssa uusia disulfidiryhmiä, jolloin muodostuu proteiiniverkkoja, jotka muodostavat suspensiossa emulgoivan proteiinikalvon vesipisaran ympärille tai vaahdossa ilmakuplan ympärille tai sopivan vahvan verkoston geelinmuodostusta varten.

Sulfhydryyliryhmät ovat hapetettavissa hapettavalla yhdisteellä edullisesti ilman happa, dehydroaskorbiinihapolla ja yleensä elintarvikelaatuksilla hapettimilla disulfididisidoksiksi edullisesti pH:ssa 4,5-8,5, edullisimmin pH 6,5-7,5, lämpötilassa 45-75 °C, edullisimmin välillä 50-70 °C ja sekoittamalla suspensiota tai liuosta tehokkaasti niin, että disulfididisidokset muodostuvat eri sulfhydryyliryhmien kanssa kuin proteiinin alkuperäisessä konformaatioissa. Lopputuote, muunneltu proteiini- tai proteiinifraktiokonsentraatti tai vastaava jauhe on pH:ltaan korkeampi kuin edellä kuvattu tuote, siinä on vähemmän vapaita sulfhydryyliryhmiä ja sillä on muuntelun asteesta johtuvia toiminnallisia ominaisuuksia kuten dispergoituvuus, emulgoituvuus, geelityvyys ja hydrolysoituvuus/sulavuus.

S-sulfoniryhmistä ja sulfiitista vapautunut ja puhalluksessa mahdollisesti poistumatta jäänyt rikkidioksidi muuttuu pH:n noston yhteydessä sulfiitiksi ja hapettuu sulfaatiksi reaktorissa puhallettaessa ilmaa ja sekoitettaessa tehokkaasti pH:ssa 4-7,

edullisesti pH 5-6 ja lämpötilassa 45-65 °C, edullisimmin välillä 50-60 °C. Kyseessä on pienen noin 0,01 %:n sulfiittimäärän hapettuminen sulfaatiksi.

5 Sulfitolyysillä voidaan edellä esitetyn periaatteen mukaan muunnella myös muita proteiineja, kuten soijaproteiineja, esimerkiksi soijaisolaatteja, -konsentraatteja ja -jauhoja, vaikka niiden muuntelu vaatii toisenlaiset olosuhteet, jotka ovat riittävät sulfitolyysin tapahtumiselle ja siten disulfididisidosten avautumiselle. Soijaisolaattien muuntelu voidaan suorittaa sulfitolyysillä esimerkiksi seuraavalla tavalla: Soijaisolaatista tehdään 6-10-prosenttinen suspensio veteen. Sulfitolyysissä käytetään sulfiittimäärää 0,02-0,2 M, edullisesti 0,05-0,10 M. Reaktiolämpötila on 60-80 °C, 10 edullisesti välillä 65-75 °C. Sulfitolyysi tapahtuu pH:ssa 5,5-8,0, edullisesti pH:ssa 6,0-7,0. Reaktioaika on 10-50 min edullisesti 20-40 min. Muuntelun jälkeen soijaisolaatti on eristettävissä ja pestävissä pH 4,5:ssä, joka on soijaproteiinien isoelektrinen piste. Ylimääräinen sulfiitti poistuu pesuveden mukana sitä täydellisemmin mitä 15 useammin pesu tapahtuu; 2-3 kertaa on riittävä. Sulfiitti on otettavissa talteen pesuvestä alentamalla pH 2:een ja puhaltamalla vapautunut rikkidioksidi vastaanottoastiaan sulfiitiksi myöhempää käyttöä varten. Tämän jälkeen, kun suurin osa sulfiitista on poistunut, muunnellun soijaisolaatin pH lasketaan 2-3:een, jolloin saostuma liukenee osittain ja sulfitolyysissä muodostuneet S-sulfonaattiryhmät vapautuvat 20 rikkidioksidina näin happamassa ympäristössä. Tarvittaessa rikkidioksidi on puhallettavissa pois tässä vaiheessa. Nostettaessa pH jälleen 4,5:een muodostunut pieni rikkidioksidimäärä muuttuu natriumvetysulfiitiksi ja se on pestävissä pois.

25 Sulfitolyysin aikaansaamalla soijaisolaatin muuntelulla voidaan inaktivoida biologisesti aktiivisia proteiineja esimerkiksi trypsiini-inhibiittori sekä parantaa proteiinin toiminnallisia ominaisuuksia vapaiden sulfhydryyliryhmien lisääntyttä muunteluasteen osoittamalla määrällä.

30 Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan heran proteiinien muuntelu, fraktiointi, eristys ja muu käsittely tapahtuu seuraavina jaksoina: Heran proteiinien konsentroidi ultrasuodattamalla, konsentraatin proteiinien rakenteen/konformaation muuntelu sulfitolyysillä, osan muunnelluista proteiineista saostaminen laskemalla pH:ta, happamassa pH:ssa sulfoniryhmistä ja sulfiitista muodostuneen rikkidioksidin puhaltaminen reaktorista sekä talteenotto sulfiittina seuraavaa sulfitolyysiä varten, 35 saostettujen proteiinien erotus liukoista proteiineista mikrosuodattamalla, saostettujen proteiinien sekä muunnettujen kokonaisproteiinien pesu ja konsentroidi ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai yleensä happamassa pH:ssa, mikrosuodatuksen suodoksen pesu ja konsentroidi ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai sen yläpuolel-

la, vaihtoehtoisesti, saostettujen proteiinien konsentraatin, muunneltujen kokonaisproteiinien konsentraatin sekä liukoisten proteiinien konsentraatin vapaiden sulfhydryyliryhmien hapetus disulfidiryhmiksi uuteen järjestykseen sekä kaikkien proteiinikonsentraattien pesu ja konsentrointi ultrasuodattamalla ja lopputuotteiksi saattaminen konsentraatteina tai kuivattuina jauheina.

Heran konsentrointi aloitetaan mikrosuodatuksella, jolloin herasta poistetaan mahdolliset kaseiinihiukkaset, ja vähennetään fosfolipoproteiinien ja bakteerien määrää. Mikrosuodatuksen tuloksena ultrasuodatus helpottuu. Saatua mikrosuodatuksen
10 suodosta ultrasuodatetaan 6000-30000 D:n kalvoilla proteiinipitoisuuden väkevöimiseksi alkuperäisestä 0,6 %:sta 16-20-kertaiseksi, joka vastaa 9-12 %:n proteiinimäärää. Edullinen konsentraatin proteiiniväkevyyks on 10-11 %.

Heraproteiinien rakenteen muuntelu tapahtuu sulfitolyysin avulla, jolloin haluttu osa
15 disulfidisidoksista aukaistaan ja saavutetaan haluttu muunteluaste alkuperäisten disulfidisidosten määrään nähden. Heraproteiinien sulfitolyysi toteutetaan tässä suoritustemuodossa seuraavalla tavalla:

Heraproteiinikonsentraattia, proteiinipitoisuus esimerkiksi 10 %, otetaan tarvittava
20 määrä reaktoriin, jossa on tehokas sekoitus sekä lämpötilan ja pH:n mittausta ja säätö. Konsentraatin lämpötilaksi säädetään 40-65 °C, edullisesti 50-60 °C. Lämpötilan valintaan vaikuttaa mm. haluttu reaktionopeus, käytetyt kemikaalit sekä eristettävälle proteiineille halutut toiminnalliset ja muut ominaisuudet. Vakiolämpöiseen proteiinikonsentraattiin lisätään sulfiittia joko NaHSO_3 :na, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$:nä tai Na_2SO_3 :na
25 0,02-0,2 M, esimerkiksi 0,05-0,1 M, ja sekoitetaan tehokkaasti. Lisättävän sulfiitin määrä riippuu mm. proteiinikonsentraatiosta ja halutusta sulfitolyysiasteesta. pH säädetään välille 5,5-8, edullisesti välille 6-7, esimerkiksi 6,5. pH:n säädössä käytetään elintarvikelaatuisia happoja ja emäksiä, kuten HCl :ää ja NaOH :ta. Reaktioaika, jonka sulfiitti vaikuttaa proteiineihin, on 10-50 min, edullisesti 20-40 min. Aika
30 määräytyy edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutuksesta halutun muunteluasteen saavuttamiseksi.

Proteiinit, halutun muuntelun jälkeen, saostetaan laskemalla pH 1,5-5,5:een, edullisesti 4,0-5,0:aan. Saostuksessa käytettävä pH riippuu pääasiassa fraktioille halutusta proteiinikoostumuksesta sekä jonkin verran proteiinien muunteluasteesta.

Saostamiseen käytetty aika on 10-40 min, esimerkiksi 20-30 min. Tietyn asteisesti muunnellut proteiinit voidaan jättää saostamatta, kun halutaan muunneltuja koko-

naisproteiineja, ja pH lasketaan suoraan tarpeeksi alas pH 1,5-4,5:een sulfoniryhmi-
en ja ylimääräisen sulfiitin vapauttamiseksi rikkidioksidina, joka puhalletaan sterii-
lillä ilmalla tai ilman ja typen seoksella vastaanottosäiliöön natrium- ja natriumve-
tysulfiitin seoksena seuraavaa sulfitolyysiä varten.

5

Saostetut proteiinit erotetaan liukoista proteiineista mikrosuodattamalla. Muodos-
tuneet jakeet käsitellään erikseen.

10

Fraktioiduista proteiineista, saostettu ja liukoinen fraktio, sulfoniryhmät ja ylimää-
räinen sulfiitti vapautetaan happamassa pH:ssa rikkidioksidina ja puhalletaan pois
reaktioseoksesta, kuten edellä on kuvattu.

15

Muodostuneet jakeet pestään suolojen ja laktoosin vähentämiseksi ja konsentroidaan
vaadittuun proteiinipitoisuuteen sekä laktoosi- ja suolapitoisuuteen happamassa
pH:ssa, esimerkiksi 4,5:ssä.

20

Haluttaessa jakeen pH nostetaan 5,5-7,5, esimerkiksi 6,5:een, sen läpi puhalletaan
steriloitua ilmaa, jolloin vapaana olevat sulfhydryyliryhmät muodostavat disulfidisi-
doksia alkuperäisestä poikkeaviin kohtiin proteiinimolekyyliin sekoituksen ansios-
ta. Käsiteltävä fraktio on pestävissä ja konsentroitavissa ennen pH:n nostoa tai sen
jälkeen tai molemmissa vaiheissa.

25

Pestyt, edellä kuvatuilla tavoilla tuotetut konsentraatit saatetaan vaadittuun proteii-
nipitoisuuteen ja ne ovat käytettävissä jatkosovellutuksiin. Konsentraatit voidaan
myös kuivata jauheeksi ja käyttää sellaisenaan jatkosovellutuksiin.

30

Sulfitolyysin kaikilla tärkeillä muuttujilla eli proteiinikonsentraatin proteiinipitoi-
suudella, sulfiitin määrällä, reaktiolämpötilalla ja -pH:lla eri vaiheissa sekä eri vai-
heissa käytetyillä reaktioajoilla voidaan vaikuttaa eristysprosessin eri osareaktioiden
toteutumiseen ja kokonaisuutena koko prosessin lopputulokseen eli eristettävien ja-
keiden proteiinien määrään, koostumukseen ja haluttuihin ominaisuuksiin.

Seuraavat esimerkit kuvaavat edellä esitettyä keksintöä.

35 Esimerkki 1

Heraproteiinikonsentraatin valmistukseen käytettiin tuoretta edam-juuston valmis-
tuksessa syntynyttä heraa. Sen proteiinipitoisuus oli 0,6 / , joka on saatu kertomalla

Kjeldahl-menetelmällä määritetty proteiinityppi vakiolla 6,38. Hera mikrosuodatettiin ensin 0,45 µm:n suodatinkalvoilla Millipore Pellicon -laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodatuksen suodos konsentroidtiin suodattamalla se samalla laitteistolla 10000 D:n ultrasuodatuskalvoilla niin, että konsentraattien proteiinipitoisuudet vaihtelivat
5 8 -12 %:n välillä.

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,5 l 8,5-paino/tilavuusprosenttista herakonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Se asetettiin lämpötilaltaan säädettävään vesihauteeseen ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla sekoittimella. Konsentraatin lämpötilaksi
10 säädettiin 45°C.

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g Na₂S₂O₅ (natriummetabisulfiittia) ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,8:aan lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla Sorvall RC-5B -sentrifugilla 10000 kierr./min 30 min. Saostuneet proteiinit erottuivat hyvin ja saatu liukoinen osa oli kirkasta. Liukoisesta osasta eli kirkasteesta määritettiin proteiinipitoisuus. Alkuperäisen proteiinikonsentraatin ja kirkasteen proteiinipitoisuuksien erotuksena voitiin laskea, ottamalla huomioon suorituksen aikana tapahtunut laimentuminen, proteiinien jakautuminen saostuneeseen ja liukoiseen osaan kokonaisproteiiniin nähden. Tässä tapauksessa saostuneen proteiinin osuus oli 21 % ja liukoisen vastaavasti 79 %.

25 Esimerkki 2

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,5 l 10,5-prosenttista edellä kuvatulla tavalla suodattamalla konsentroitua heraproteiinikonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpötilaksi säädettiin 50 °C ja sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta.
30

Seosta sekoitettiin edelleen ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 5,3:een lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin osuus oli 16 / ja liukoisen vastaavasti 84 %.

Esimerkki 3

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,5 l 10,5-prosentista edellisessä esimerkis-
sä käytettyä heraproteiinikonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpöti-
laksi säädettiin 55 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi suoritettiin lisää-
mällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan
lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin koko ajan ja reaktio sai jatkua 30 min. Tä-
män jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,8:aan lisää-
mällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saos-
tuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin
osuus oli 26 % ja liukoisen vastaavasti 74 %.

Esimerkki 4

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,45 l 9,0-prosentista heraproteiinikonsent-
raattia 1,0 l:n lasiastiaan. Heraproteiinikonsentraatti oli laimennettu teollisesti dia-
suodatuksella tuotetusta 16-prosentista konsentraatista, joka oli ennen laimentamis-
ta mikrosuodatettu 0,45 µm:n kalvolla Millipore Prostat -laitteistolla mahdollisten
kaseiinihiukkasten poistamiseksi ja lipoproteiinien vähentämiseksi. Konsentraatin
lämpötilaksi säädettiin 55 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 3,25 g natriummetabi-
sulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin koko ajan
ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostet-
tiin laskemalla pH ensin 5,3:aan ja sen jälkeen 4,8 lisäämällä seokseen HCl:ää. Sa-
ostumaa sisältävää seosta sekoitettiin pH:n laskun jälkeen vielä 15 min ennen näyt-
teenottoa. Saostumat erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostu-
neen proteiinin osuus pH 5,3:ssa oli 39 % ja liukoisen 61 %. Vastaavat luvut pH
4,8:ssa olivat 46 % ja 54 %.

Geelielektroforeesimääritykset osoittivat, että pH 5,3:ssa fraktoidussa liukoisessa
osassa oli vielä vähän BSA:ta (naudan seerumialbumiinia) mukana β-laktoglobuliini-
nin lisänä, mutta pH 4,8:ssa BSA:ta ei enää ollut, vaan β-laktoglobuliinia pelkäs-
tään.

Esimerkki 5

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,5 l 8,57-prosenttista herakonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpötilaksi säädettiin 60 °C ja sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 4,8 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,5:een lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin osuus oli 66 % ja liukoisen vastaavasti 34 %.

Esimerkki 6

- 15 l:n reaktoriin, jossa oli sekoitus, lämpötilan ja pH:n säätö sekä kaasun puhallusmahdollisuus reaktorin pohjalta, otettiin laboratoriolaitteilla mikrosuodatettua ja ultrasuodatuksella konsentroitua 11,1-prosenttista heraproteiinikonsentraattia 9,0 l heraproteiinin muuntelua varten. Konsentraatin lämpötila säädettiin 55 °C:een ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.
- 20 Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 63 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktion annettiin jatkua 30 min. Tämän jälkeen muunnellun proteiinikonsentraatin pH laskettiin lisäämällä HCl:ää ja sekoittaen 2,0:aan, jossa sulfiitista suurin osa on tasapainoreaktion osana rikkidioksidina sekä muunteluasteen osoittamiin määriin disulfididisidoksia muodostuneet S-sulfonaattiryhmät ovat vapautuneet myös rikkidioksidina. Sekoitusta jatkettiin 15 min. Rikkidioksidin poistamiseksi puhallettiin reaktoriin steriloitua ilmaa 3 l/min noin tunnin ajan samalla sekoittaen tehokkaasti, jolloin rikkidioksidi poistui puhalletun ilman ja vesihöyryn mukana. Rikkidioksidipitoinen ilma otettiin vastaanottoastiaan, jossa se pH 7,0:ssa liuotettiin veteen ja neuraloitiin natrium- ja natriumvetysulfiitin seokseksi. Tämän jälkeen muunnellun proteiinikonsentraatin pH nostetaan 5,0:aan ja mahdollisesti rikkidioksidin poistopuhalluksen jälkeenkin jäänyt pieni sulfiittimäärä hapetettiin sulfaatiksi puhaltamalla steriiliä ilmaa reaktoriin edellä kuvatulla tavalla ja samalla sekoittaen noin 30 min ajan.
- 35 Tämän jälkeen muunneltu proteiinikonsentraatti pestiin diasuodattamalla 10000 D-ultrasuodatuskalvoilla kolme kertaa omalla tilavuudellaan vettä, jolloin laktoosin ja suolojen määrä väheni yhteen kolmasosaan. Saatu muunneltu proteiinikonsentraatti on koostumukseltaan alkuperäisen kaltainen, mutta sen toiminnalliset ominaisuudet

ovat muuttuneet, mm. sen pepsiinihydrolysoituvuus (hydrolyysinopeus) on alkupe-
räiseen konsentraattiin nähden 2,2-kertainen kolmen tunnin aikana

Esimerkki 7

5

Esimerkissä 4 mainittua 9,0-prosentista heraproteiinkonsentraattia otettiin esimer-
kissä 6 mainittuun reaktoriin 7,0 l muuntelua ja fraktiointia varten. Konsentraatin
lämpötila säädettiin 55°:een ja sekoitettiin tehokkaasti.

- 10 Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinkonsentraattiin 32 g natriummetabi-
sulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan NaOH:lla. Seosta sekoitettiin ja reaktion annettiin
edetä 30 min. Tämän jälkeen osa proteiinkonsentraatin muunnelluista proteiineista
saostettiin laskemalla pH 4,5:een HCl:llä. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin
15 vielä 15 min saostuneen ja liukoisen proteiinien määrän tasapainottumiseksi. Saos-
tuneet proteiinit erotettiin saostuksen jälkeen suodattamalla 0,45 µm:n mikrosuoda-
tuskalvoilla ja pestiin kerran omalla tilavuudellaan vettä. Suodos otettiin talteen ja
käytettiin mikrosuodatuksen suodoksen eli liukoisen osan ensimmäisenä pesuvetenä.

- 20 Saostuman pH laskettiin HCl:llä 2,0:aan ja vapautunut rikkidioksidi puhallettiin pois
ja sen jälkeen pH nostettiin 5,0:aan ja puhallettiin uudelleen pienen sulfiittijäämän
hapettamiseksi sulfaatiksi, kuten esimerkissä 6 on kuvattu. Lopuksi tämä fraktio
pestiin ultrasuodattamalla laktoosin ja suolojen vähentämiseksi sekä konsentroitiin
10 %:n proteiinipitoisuuteen.

- 25 Liukoisesta osasta poistettiin sulfiitti- ja S-sulfoniryhmät kuten edellä tehtiin saostu-
neen osan kohdalla. Sen jälkeen pH nostettiin 4,5:een ja pestiin ultrasuodattamalla
ensin mikrosuodatuksen pesuviedellä ja sitten kaksi kertaa vedellä ja konsentroitiin
15 %:n proteiinipitoisuuteen.

Esimerkki 8

30

Soijaproteiinin muuntelua varten sekoitettiin 70 g isolaattia 1,0 l:aan vettä 2 l:n lasi-
astiassa. Soijaisolaatin proteiinipitoisuus oli noin 85 %. Suspension lämpötilaksi
säädettiin 70 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

35

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä isolaattisuspensioon 9,5 g natriummetabisul-
fiittia ja pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Reaktioaika oli 30 min ja koko ajan sus-
pensiota sekoitettiin tehokkaasti.

Muuntelun jälkeen suspension pH laskettiin 4,5:een, jolloin soijan proteiinit saostuivat. Saostuma sentrifugoitiin 10000 kierr./min. 30 min, jolloin proteiinisaostuma jäi putken pohjalle ja kirkkaaseen vesikerrokseen, kirkasteeseen jäivät suolat mm. sulfiitti sekä vähän proteiinia (noin 0,5 %). Kahden pesukerran jälkeen suolojen
5 määrä pieneni olennaisesti, mutta näissä pesuvesissä proteiinia oli vain nimeksi. Pesujen jälkeen pH laskettiin 2,5:een ja pidettiin siellä 15 min samalla sekoittaen.

pH nostettiin uudelleen 4,5:een, jossa saostuma pestiin vielä kerran ja alkuperäiseen konsentraatioon liuotetun proteiinin pH nostettiin 6,0:aan. Tämä oli lopputuote,
10 josta tehtiin trypsiini-inhibiittorin aktiivisuuden määrittäminen sekä geelielektroforeesimäärittäminen proteiinin molekyylipainon jakautumisesta. Trypsiini-inhibiittorin aktiivisuus määritettiin menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E. ja Puski, G., Cereal Chem. 51 (1974), 376-382.

15 Määrittäytulosten mukaan muunnettu soijaisolaattiproteiini oli menettänyt kokonaan trypsiini-inhibiittoriaktiivisuutensa, mutta vertailuna käytetyssä alkuperäisessä isolaattiproteiinissa aktiivisuutta oli menetelmässä käytetyn laimennussarjan väkevimmässä ja toiseksi väkevimmässä näytteessä selvästi ja kolmannessa havaittavasti. Geelielektroforeesimäärittäminen osoitti vertailtaessa alkuperäisen soijaisolaatin ja muun-
20 nellun isolaatin proteiinimolekyylien jakautumaa, että muunnellussa isolaatissa molekyylipainoltaan pienempien proteiinien eli isompien proteiinien osaproteiinien määrä oli selvästi lisääntynyt.

Edellä on esitetty eräitä keksinnön sovelluksia. Keksintöä luonnollisesti ei rajoiteta
25 edellä esitettyihin esimerkkeihin, vaan keksinnön mukaista periaatetta voidaan muunnella patenttivaatimusten suoja-alan puitteissa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä proteiinin, erityisesti hera- tai soijaproteiinien, muuntelemiseksi ja eristämiseksi, **tunnettu siitä, että**
 - 5 a) saatetaan proteiini, kuten hera tai soija tai sen konsentraatti, kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi ilman hapetinta, ja
 - b) saostetaan sulfonoitu proteiini happamassa pH:ssa, ja
 - c) otetaan sulfonoitu proteiini tai saostunut ja/tai liukoinen sulfonoitu proteiini talteen ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** hera tai sen konsentraatti saatetaan kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi lämpötilassa 40-65 °C, edullisesti 50-60 °C.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** herakonsentraatin proteiinipitoisuus on 9-12 paino-%.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** soija tai sen konsentraatti saatetaan kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa
- 20 proteiinin sulfonoimiseksi lämpötilassa 60-80 °C, edullisesti 65-75 °C.
5. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 4 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** kohdassa (a) pH säädetään arvoon 5,5-8, edullisesti 6-7.
- 25 6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** kohdan (a) sulfonoinnissa käytetään sulfiittia 0,02-0,20 M, edullisesti 0,05-0,10 M.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** proteiinin sulfonoitumisasteeseen vaikutetaan reaktio-olosuhteita ja reagenssien määrää muuttamalla.
- 30 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** sulfonoidut proteiinit saostetaan koostumukseltaan erilaisina fraktioina pH-arvoa säätelemällä.
- 35 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** sulfonoidut proteiinit saostetaan laskemalla pH arvoon 1,5-5,5, edullisesti arvoon 4,0-5,0.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sulfonoiduista proteiineista tai saostuneesta ja/tai liukoisesta sulfonoidusta proteiinista poistetaan sulfoniryhmät sekä samasta liuksesta sulfiitit laskemalla pH noin 1,5-4:ään, jolloin molemmat vapautuvat rikkidioksidina ja proteiiniin muodostuu vapaita sulfhydryyliryhmiä.
- 5
11. Patenttivaatimuksen 1 tai 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että jäljelle jäänyt sulfiitti hapetetaan sulfaatiksi puhaltamalla ilmaa seokseen pH:ssa 4-7.
- 10
12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vapaita sulfhydryyliryhmistä muodostetaan uudelleen disulfidiryhmiä puhaltamalla ilmaa proteiiniseokseen, jonka pH on 4,5-8,5 ja lämpötila 45-75 °C.

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää proteiinien eristämiseksi herasta tai soijasta ja eristettyjen proteiinien muuntelemiseksi, jossa menetelmässä

- a) saatetaan hera tai soija tai sen konsentraatti kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi, ja valinnaisesti
- b) saostetaan sulfonoitu proteiini happamassa pH:ssa, ja
- c) otetaan sulfonoitu proteiini tai saostunut ja liukoinen sulfonoitu proteiini talteen ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 47440/IR/MG	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FI99/00347	International filing date (day/month/year) 28.04.1999	Priority date (day/month/year) 29.04.1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC ₇ A 23 J 1/20, A 23 J 3/08, A 23 C 9/00, A 23 C 21/00		
Applicant Savolainen Jouko		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16.11.1999	Date of completion of this report 05.09.2000
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. 08-667 72 88	Authorized officer Eva Johansson/gh Telephone No. 08-782 25 00

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages _____, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, ~~sheets~~/fig _____, as originally filed,
~~sheets~~/fig _____, filed with the demand
~~sheets~~/fig _____, filed with the letter of _____,
~~sheets~~/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, ~~sheets~~/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	<u>1-12</u>	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>1-12</u>	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-12</u>	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The claimed invention relates to a method for modification of and isolation of a protein, especially whey or soy protein. The method is characterised in that a protein is brought into contact with a reagent that forms sulfite ions in order to sulfonate the protein without using an oxidising agent and the sulfonated protein is precipitated at an acid pH and then recovered and optionally further processed.

The following documents are cited in the search report:

- A) WO 9522907 A1 (Sävolainen, Jouko), 31 August 1995 (31.08.95)
- B) J. Agric. Food Chem., Volume 43, 1995 Silvana Petruccelli et al, "Partial Reduction of Soy Protein Isolate Disulfide Bonds" page 2001 - 2006
- C) Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 37, No 5, 1989, Navin K.D. Kella et al, "Effect of Disulfide Bond Cleavage on Structural and Interfacial Properties of Whey Proteins" page 1203 - 1210
- D) Journal of Food Science, Volume 55, No 6, 1990, Juan M. Gonzalez et al, "Recovery of Protein from Raw Sweet Whey Using a Solide State Sulfitolysis" page 2 - page 6

The most relevant document A) relates to a method for isolating protein from whey, wherein a) whey and a reagent which forms sulfite ions and an oxidant are brought into contact to sulfonate, i.e. sulfitolyse and oxidise the whey protein, b) the sulfitolysed and oxidised whey protein is precipitated out from the whey at an acid pH and then recovered.

.../...

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: V

The claimed invention differs from the known method in document A) in that there is no oxidation step in the claimed process and that after sulfonation the whey protein can be precipitated by lowering the pH to an acidic level.

It has been shown that the sulfonation of the protein can be accomplished by the sulfitolysis alone, and from reading the cited documents, it would not be obvious to a person skilled in the art to sulfonate the protein with the claimed method.

Thus, the claimed invention is considered to fulfil the requirements of novelty, inventive step and industrial applicability.

Documents B), C) and D) relate to the general state of art and are not considered being of particular relevance.

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 11 January 2000 (11.01.00)	
International application No. PCT/FI99/00347	Applicant's or agent's file reference 47440
International filing date (day/month/year) 28 April 1999 (28.04.99)	Priority date (day/month/year) 29 April 1998 (29.04.98)
Applicant SAVOLAINEN, Jouko	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 November 1999 (16.11.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer C. Cupello
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38